

张雪燕 主编

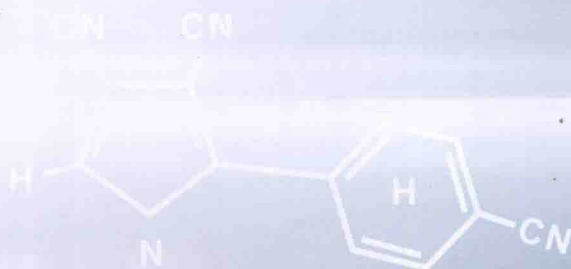
21世纪高等医药院校教材

BIOCHEMISTRY EXPERIMENTS



生物化学实验

(第三版)



兰州大学出版社
LANZHOU UNIVERSITY PRESS

生物化学实验



生物化学实验

(第三版)

BIOCHEMISTRY EXPERIMENTS

主 编：张雪燕

副主编：姚海燕 阎 波 张哲文

编 者：（按拼音排序）

陈 卫 高丽萍 耿 哲 韩跃武
郝春燕 林 利 王凯荣 王玉平
肖尚英 谢俊秋



兰州大学出版社
LANZHOU UNIVERSITY PRESS

图书在版编目 (C I P) 数据

生物化学实验 / 张雪燕主编. — 3版. — 兰州 :
兰州大学出版社, 2015. 7
ISBN 978-7-311-04803-7

I. ①生… II. ①张… III. ①生物化学—化学实验—
高等学校—教材 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆CIP数据核字 (2015) 第188530号

策划编辑 陈红升
责任编辑 佟玉梅 陈红升
封面设计 郇海

书 名	生物化学实验(第三版)
作 者	张雪燕 主编
出版发行	兰州大学出版社 (地址:兰州市天水南路222号 730000)
电 话	0931-8912613(总编办公室) 0931-8617156(营销中心) 0931-8914298(读者服务部)
网 址	http://www.onbook.com.cn
电子信箱	press@lzu.edu.cn
印 刷	甘肃北辰印务有限公司
开 本	787 mm×1092 mm 1/16
印 张	8.25(插页2)
字 数	193千
版 次	2015年8月第1版
印 次	2015年8月第1次印刷
书 号	ISBN 978-7-311-04803-7
定 价	26.00元

(图书若有破损、缺页、掉页可随时与本社联系)

前 言

生命科学在21世纪有着惊人的发展,生物化学是其中最为活跃的学科之一,其主要任务是了解生物的化学组成、结构及生命过程中各种化学变化过程。生物化学作为生命科学的核心,其理论、方法、技术在各个研究领域都得到了广泛应用,尤其是在医药领域显得更为重要。生物化学实验是生物化学理论的延续和拓展,生物化学实验及技术的不断开发和应用是促使生物化学迅猛发展的重要因素之一。目前,生物化学早已成为许多相关学科各层次学生的必修课程。对于医药院校各专业学生而言,生物化学是一门非常重要的专业基础课,而生物化学实验课是对其理论课的进一步完善和补充。

《生物化学实验》作为一本面向临床医学、药学及相关专业本科生的实验教材,于2006年8月出版使用至今。随着生物化学学科的发展,特别是生物化学理论与技术在医药领域越来越广泛的应用,医药院校的学生对生物化学实验技能有了新的需求,教材内容需要更新。因此,根据学科发展需要,针对培养综合型人才的目标,对本书进行修订。

本书在第二版《生物化学实验》的基础上,根据多年的教学、科研经验,参考国内、外的生化实验教材,对第二版教材中的内容进行了必要的调整和修改,增加了一些反映最新进展的实验技术,补充了许多新的实验内容。全书分为十一章,包括生物化学实验的基本要求、普通实验、综合实验、设计实验、开拓性实验等内容。除了生物化学基础性实验外,我们保留了第二版教材中一些教学效果较好的精选实验,旨在紧密联系理论教学和培养学生的综合能力。本书适当地提高了综合性实验的比例,增加了细胞色素C的分离制备和测定、脱辅基血红蛋白的制备和重组以及果胶的提取测定与胶冻的制备等实验内容。

本书在编写过程中力求做到简明、扼要、实用性强。本书适用于高等医药院校基础生物化学实验教学,可供临床医学、检验医学、护理、预防、药学等专业根据各专业特点选择使用。

虽然编者在本次修订过程中力求严谨和正确,但限于学识水平与能力,书中难免会有不足及疏漏,殷切希望读者批评指正。

编者

2015年6月

目 录

第一章 生物化学实验的基本要求	1
第一节 实验的准确性	1
第二节 实验记录及报告	8
第三节 实验样品的制备	9
第四节 玻璃仪器的洗涤及各种洗液的配制法	10
第五节 试剂的配制及一些常用数据表	12
第二章 普通实验	14
实验一 分光光度法测定血红蛋白含量及血糖	14
实验二 蛋白质浓度的测定	22
实验三 蛋白质变性、沉淀及等电点的测定	25
实验四 血清蛋白质的醋酸纤维薄膜电泳	28
实验五 蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳	30
实验六 影响酶活性的因素	34
实验七 碱性磷酸酶 K_m 值测定	36
实验八 肌糖原的酵解作用	39
实验九 脂肪酸的 β -氧化	41
实验十 酮体的生成	44
实验十一 血清谷丙转氨酶活性的测定	46
实验十二 胡萝卜素的柱层析	48
第三章 综合实验	51
实验一 大麦萌发前后淀粉酶活力比较	51
实验二 细胞色素 C 的分离制备和测定	53
实验三 脱辅基血红蛋白的制备和重组	56
实验四 果胶的提取测定与胶冻的制备	59
实验五 质粒 DNA 的提取及电泳鉴定	62
实验六 动物肝脏 DNA 的提取与二苯胺测定	65
实验七 植物总 DNA 的提取(CTAB 法)	68
第四章 设计实验	72
第五章 开拓性实验	73
实验一 从动物毛发中提取 DNA 进行 RAPD 扩增	73

实验二 DNA 指纹图谱分析	75
第六章 方法学评价实验	79
实验一 线性范围实验	79
实验二 批内重复性实验	81
实验三 回收实验	84
实验四 干扰实验	85
实验五 方法比较实验	87
实验六 检测能力测定	90
第七章 实验室安全知识及防护知识	93
第八章 常用生化仪器的使用方法	96
第一节 称量仪器	96
第二节 分光光度计	99
第三节 离心机	102
第四节 干燥箱和恒温箱	103
第五节 电热恒温水浴	104
第六节 自动部分收集器	104
第七节 核酸蛋白检测仪	105
第八节 酸度计	106
第九节 移液器	107
第九章 缓冲溶液	109
第一节 缓冲理论	109
第二节 常用缓冲液的配制方法	109
第十章 电泳染色方法	113
第一节 核酸染色	113
第二节 蛋白质染色	114
第三节 糖蛋白染色	115
第四节 脂蛋白染色	116
第五节 同工酶染色	116
第十一章 常用的核酸和蛋白质序列数据分析工具	123
附 录	124
参考文献	126

第一章 生物化学实验的基本要求

第一节 实验的准确性

生物化学实验是以活的生物体为对象,对生物体内存在的主要大分子物质,如糖、脂肪、蛋白质、核酸等进行定性或定量的分析测定。定性分析是确定存在物质的种类,或粗略计算物质所占的比例;而定量分析则需要确定物质的精确含量。因此,分析工作者要根据实验要求对实验结果进行分析和总结,要善于分析和判断结果的准确性,认真查找可能出现误差的原因,并进一步研究减少误差的办法,以不断提高所得结果的准确度。

一般在实验测量过程中都会有误差产生,但在懂得这些误差的可能来源的前提下,多数的误差是可以通过适当的处理来校正的。

产生误差的原因很多,一般根据误差的性质和来源可把误差分为两类,即系统误差和偶然误差。

一、有效数字

做实验每天接触千千万万的数字,什么是有效数字?是否小数点后数字愈多愈准确?数字1、2、3、4、5、6、7、8、9是有效数字。零可能是有效数字,也可能不是,如果零只用来表示小数点的位置时,它就不是有效数字。例如,0.070 080 kg,这个数字的前两个零都不是有效数字,它们只是用来表示小数点的位置。如改用另一个单位,即可把它们取消,如采用克为单位,就可写成70.080 g。7和8之间的两个零,是有效数字,如去除其中的一个或两个零,数值就完全变了(0.070 8 kg或0.078 0 kg)。最后一位零也是有效数字,它指出在该项称重中,可以测定到0.000 010 kg,只不过数字正好是零。如果将最后的零去除,则意味着重量只能称到0.000 01 kg。有效数字的位数说明一个测定的准确度,应当符合这个测定(包括这个测定的每一个步骤)总的准确度。在做一项测定(长度、重量、容积、光密度、时间、电流、电压等),进行一项计算或报告一项实验结果,在数值上都可包括一位估计的数字。例如,用一刻度最小到毫米的尺来量一个长度时,可以估算到刻度的1/10,就是估计到0.1 mm,如623.3 mm,0.3这个数是估计的,真实的数可能是623.1 mm或623.5 mm,最后一个数字是有误差的。如计算一个乘数,将3.625 mg/mL,乘以1.26时,在乘积中的值只能保留三位数字,因为乘积不可能比它原来的数字更为准确;又如将几个数值相加(0.410+0.1263+9.04),其和应是9.58,而不是9.576 3,因为数的和不会比它准确度最差的一项更好。据以上原因,在一个测定的各个环节中和可能的范围内要注意应选择准确度相类似的仪器,否则在某一环节中使用了一次准确度很低的仪器,则整个测定结果的准确度便降低了。同样,在某一个实验环节中使用了一次准确度很高的仪器,这种测量也是徒劳无功的,毫无意义。例如,在滴定管的校正中,由于滴定管只能读到四位有效数字如32.18 mL时,水及称量瓶的重量也只需称到四位有效数字如49.19 g,虽然分析天平可称至有效数六位,也是无用的。这时可改用准确数为四位的天平即可。

二、误差

误差是指一种被测物的测定结果与其真值的不符合性,真值往往是不能确切知道的,通常以多次测定结果的平均数来近似地代表真值。尽管实验的分析方法相当准确,仪器亦很精密,试剂纯度很高,操作者技术很熟练,然而这些都不能使某种物质的测定结果与其真值绝对相符。同一个样本多次重复测定,其结果亦不能完全相同。因此实验中的误差是绝对的。根据误差的来源和性质,通常可分下述三大类。

1. 系统误差

系统误差是指一系列测定值存在有相同倾向的偏差,或大于真值,或小于真值,一般是恒定的,多是由于某种确定的原因引起的,在一定条件下可以重复出现。误差的大小一般可以测出,经分析找出原因,可采取一定措施减少或纠正误差。

(1) 系统误差的来源

①方法误差:如用滤纸称量易潮解的药品;做生物实验特别是酶的实验时,没有考虑温度的影响等。

②仪器误差:如量取液体时,按烧杯的指示线量取液体往往准确度降低,需要用量筒量取;在配制标准溶液时量筒同样不够精确,要选用等体积的容量瓶定容到刻度线;不同的天平其精度差别很大,如称量100 g以上的物体,使用托盘天平即可,但如称量1 g的样品,选用扭力天平比较方便,称量10 mg以内的样品则必须使用感量为万分之一克的分析天平或电子天平称取。

③试剂误差:如试剂不纯或蒸馏水不合格,引入微量元素或对测定有干扰的杂质,就会造成一定的误差。

④操作误差:如在使用移液管量取液体时,由于每人的操作手法不同,可能会存在一定的操作误差。特别是在读数据时,目光是否平视,视线与液体弯月面是否相切,都可能成为生化实验中造成较大误差的主要原因。

(2) 系统误差的校正

①仪器校正:在实验前对使用的砝码、容量皿或其他仪器进行校正,对pH计、电接点温度计等测量仪器进行标定,以减少误差。

②空白实验:在任何测量实验中都应包括有对照的空白实验。用同体积的蒸馏水或样品中的缓冲液代替待测溶液,并严格按照待测液和标准液同法处理,即得到所谓的空白溶液。在最后计算时,应从实验测得的结果中扣除从空白溶液中得到的数值,即可得到比较准确的结果。

2. 偶然误差

与系统误差不同,误差的大小、正负是偶然发生的。误差时大时小,时正时负,不固定,一般不可预测。分析的步骤愈多,出现这种误差的机会愈多,所以也不易控制。如遇到这种情况时,应对仪器、试剂、方法做全面检查。一般生物类实验的影响因素是多方面的,常常由于某些条件,如温度、光照、气流、反应时间、反应体系的微小变化都会引起较大的误差。特别是某些因素的作用机理目前仍不十分清楚,所以有些实验结果重现性较差。

偶然误差初看起来似乎没有规律性,但经过多次实验,便可发现偶然误差分布有以下规律:一是正误差和负误差出现的概率相等;二是小误差出现的频率高,而大误差出现的

频率较低。因此,解决偶然误差主要可通过进行多次平行实验,然后取其平均值来弥补。测试的次数越多,偶然误差的概率就越小。

3. 责任误差

这种误差是由于工作人员工作态度不严肃,责任心不强,思想不集中,操作粗枝大叶所引起的。这种误差是可以避免的。对于初做生物化学实验的工作者来说是经常发生的,如加错试剂,在配制标准溶液时固体溶质未被溶解就用容量瓶定容,在称量样品时未关升降钮就加砝码,在做电泳时点样端位置放错,在做抽滤实验时应留滤液却误留滤渣,在作图时坐标轴取反以及记录和计算上的错误等。这些失误会对分析结果产生极大的影响,致使整个实验失败。所以,在实验中一定要避免操作错误,培养严谨和一丝不苟的科学实验作风,养成良好的实验习惯,减少失误的发生。

此外,在实际工作中要根据实验目的,设计好切实可行的实验方案,并根据实际需要的准确度来选择测试手段(仪器及方法)。如在做定性实验时,称量及配制试剂可相对粗些,可选择台秤及量筒来称重、量取;而在做定量实验时,则必须使用分析天平及容量瓶来称量、定容,以确保实验数据真实可靠。

三、误差的表示方法和计算

实验误差为统称,严格地说应包括误差和偏差。所谓误差是指测定值与真值之差;而偏差是指测定值与测定均值之差。但通常将这两者混用,统称为误差。

1. 平均误差

平均误差是指一组测定值中,测定值与测定均值的算术平均偏差。

$$d_m = \frac{\sum |d_i|}{n}, d_i = (X - \bar{X})$$

式中: d_m 为平均误差, X 为测定值, $\bar{X}$ 为均值, d_i 为离均差, n 为次数。平均误差的缺点是取绝对值,无法表示出各次测量间彼此的符合情况。

2. 标准误差(标准差)

标准误差是指一组测定值中,每一个测定值与测定平均值间的偏离程度(详见统计方法)。

3. 绝对误差

绝对误差是指测定值与真值间的差数,是表示准确度的一种方法。

$$\text{绝对误差} = \text{测定值}(X) - \text{真值}(U)$$

绝对误差有正值与负值,正值说明结果偏高,负值说明结果偏低。测定值与测定均值间的差异为绝对误差。所谓真值是未知的,实际上需用多次精确测定的结果(平均值),代替真值来使用,但一定要消除系统误差之后,所以:

$$\text{绝对误差} = \text{测定值}(X) - \text{测定均值}(\bar{X})$$

4. 相对误差

绝对误差表示误差绝对值的大小,在应用上受到一定的限制,无法比较测定中误差相互之间的大小。为了便于误差间的相互比较,常用相对误差。实践中常用的是:

$$\text{相对误差} = \frac{\text{测定值} - \text{真值}}{\text{真值}} \times 100\%$$

$$\text{相对偏差} = \frac{\text{测定值} - \text{测定均值}}{\text{测定均值}} \times 100\%$$

四、与质量控制有关的几个基本概念

1. 准确度

准确度是指测定值与真值之间相符合的程度,测定值愈接近真值,测定结果的误差愈小,准确性愈高,说明方法愈好。衡量准确度通常用回收实验,即在样品中加入一定量的已知浓度的标准液,测定回收量,计算回收率,以百分数表示。

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{加标准液后的测定值}}{\text{测定样品量} + \text{标准量}} \times 100\%$$

2. 精密度

精密度是指在相同条件下,用同一仪器,同一方法,对同一标本进行多次重复测定时,测定值与测定均值之间或各测定值间的符合程度。它是衡量在规定条件下实验方法测定结果的稳定性、重复性的一个指标,它只代表各测定值的分散和密集的程度。各测定值之间彼此愈接近,表示重复性愈好,测定值的偏差愈小,精密度愈高,方法愈稳定。

精密度与准确度有一定的关系,但两者不是统一的,精密度高不等于准确度高,反之亦然。准确度的高低是表示测定结果的好坏,系统误差的大小;而精密度的高低是说明方法稳定性、重复性的好坏。只有在消除了系统误差之后,使用精密度高的方法,才能做到既精密又准确,可称之为精确的方法。

3. 灵敏度

灵敏度的高低有几种表示方法:一种是指被测物质单位浓度变化所引起的指示物量的变化如吸光度,相同的单位浓度引起吸光度变化大的,称之为灵敏度高,反之称灵敏度低。灵敏度与取样体积、分析方法以及最后比色或检测需要量都有密切关系。要使方法的灵敏度保持稳定,必须结合灵敏度及准确度做全面考虑。特别是在微量分析中,空白值的大小及稳定性对灵敏度影响很大,不可忽视。

五、统计学的一些基本概念和计算公式

人们在工作、学习、日常生活中常常遇到各种各样的问题,也就需要解决各种问题,可以说,解题是人类最经常、最重要的活动之一。科学研究亦可是解题的过程,例如提出某种生理现象与疾病的发生有何关系。为了解决这个问题,必须提出一系列的小问题,进行观察和实验,然后对所得数据进行分析,从而得出问题的结论等。整个过程可分以下几个步骤:提出问题→实施设计→实验→数据分析→得出结论。概括起来,前面三项是取得数据,后面两项是分析数据。为了解决科研提出的问题,往往需要做许多观察,得到大量的数据,这时就需要进行统计。

统计学有两个重要的职能:一个是压缩数据,另一个是由一个样本(指一组数据)推断总体。压缩数据,即是将千千万万的数据经处理成为简单的数,如平均值、百分率等。但这还不够,这只反应一组数据(一个样本)。一个样本不能作为对整体的推断,从样本到整体,从部分到全体,必须做归纳推理,所以要做统计学处理。

1. 标准差

一个样本的平均值只说明资料量数的水平,不能说明资料中个体的分散情况和程度。同一平均数的资料,可有不同的分散度。例如,12、13、14、15、16、17、18的均数为15;1、4、10、20、26、29的均数也是15,但后者的分散度较前者大得多,因此,需要

有方法来说明资料变异情况。标准差就是用来表示资料变异程度的方法之一。

小样本的标准差算法，公式如下：

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N - 1}} = \sqrt{\frac{\sum X^2 - \sum X^2 / N}{N - 1}}$$

S 为标准差， X 为量数或变异数， $\bar{X}$ 为平均数， N 为例数或观察的次数， $N-1$ 为自由度。

如样本很大，用此公式不太合适，需用其他公式。一般大样本即用计算机计算，在此不多介绍。

2. 标准误

从一个整体中抽出许多个样本，便会得到许多均数；这些均数的标准差，就称标准误。标准误是表示一批均数的分散情况，正如标准差表示每一个数量的分散情况一样。实验的标准误，可用来表示同样实验重复若干次，每次结果的离散程度。精密的实验，应该每次结果相差很小，如果相差很大，说明实验中存在问题。所以计算实验标准误，可以知道实验的精密度如何，亦可知道实验的重复性如何。如果求得的标准误小，则重复实验得到同样结果的可能性就大，也就是实验的精密度大，或重复性好。事实上我们不可能重复许多次实验，汇集许多均数，我们通常只有一个样本，所以就从这个样本（一次实验）的结果来估算标准误，如标准误很小，表示这次实验有一定的代表性，结果比较可靠，反之则否。

标准误 ($S_{\bar{X}}$) 的计算公式如下：

$$S_{\bar{X}} = \frac{S}{\sqrt{N}} = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N(N - 1)}}$$

标准误除了可表示实验的精确度外，还可以用来计算两组实验之间相比有无显著差别（称显著性）。

3. 显著性的测定 (t 值的计算)

显著性是说明这次实验是否由于机遇，或由于必然规律得到，换句话说，这次结果是偶然的，还是有意义的。如对一批测试者前后做两次观察，第一次和第二次实验是同一批测试者，观察两次实验是否有显著性差异，可用显著性来计算。例如，观察豚鼠注射肾上腺素对支气管灌流液经过支气管流速的变化，以每分钟的滴数计算，实验结果见表 1-1。

表 1-1 肾上腺素对豚鼠支气管灌流流速影响表

豚鼠号	用药前	用药后	增加数(X)	X^2
1	30	46	16	256
2	38	50	12	144
3	48	52	4	16
4	48	52	4	16
5	60	58	-2	4
6	46	64	18	324
7	26	56	30	900
8	58	54	-4	16
9	46	54	8	64
10	48	58	10	100
11	44	36	-8	64
12	46	54	8	64
			96	1968

求 t 值的公式为:

$$t = \frac{\bar{X} - m}{S_{\bar{X}}}$$

$\bar{X}$ 为实验后增加均数, m 为实验前均数, $S_{\bar{X}}$ 为标准误。

按上表算出实验后增加的:

$$\bar{X} = 96/12 = 8(\text{滴})$$

按公式求出标准差:

$$S = \sqrt{\frac{1968 - (96)^2/12}{12-1}} = \sqrt{\frac{1968 - 768}{11}} = \sqrt{\frac{1200}{11}} = \sqrt{109.09} = \pm 10.44(\text{滴})$$

再求标准误:

$$S_{\bar{X}} = \frac{S}{\sqrt{N}} = \frac{10.44}{\sqrt{12}} = \frac{10.44}{3.46} = 3.02$$

求 t 值:

$$t = \frac{\bar{X} - m}{S_{\bar{X}}} = \frac{8 - 0}{3.02} = 2.649$$

自由度 = $12 - 1 = 11$

查 t 值表: 5% 为 2.201,

1% 为 3.106。

所以 $P < 0.05$ 有显著性。

从此结果可以得出, 加肾上腺素, 流速有显著的增加。

以上计算可用于实验动物个体差异较大时, 可以做自身对照的比较, 这些实验设计, 可以消除个体差异的因素, 但不是所有的实验都可以做自身比较的。因此, 必须进行组与组间的比较。

组间比较计算公式如下:

计算两组的均值为 $\bar{X}_1$ 及 $\bar{X}_2$ 。

计算两组离均数平方和为 $\sum(X_1 - \bar{X}_1)^2$ 及 $\sum(X_2 - \bar{X}_2)^2$,

求出综合估计标准差:

$$S = \sqrt{\frac{(X_1 - \bar{X}_1)^2 + (X_2 - \bar{X}_2)^2}{(N_1 - 1) + (N_2 - 1)}}$$

估计差数标准误:

$$S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} = S\sqrt{1/N_1 + 1/N_2}$$

$N_1 = N_2$ 时:

$$S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} = S\sqrt{2/N} = \sqrt{2S^2/N}$$

计算 t 值:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}}$$

最后根据自由度 (N_1+N_2-2) 及 t 值查表 1-2 得到 P 值。 P 值 < 0.05 即有显著性; P 值 < 0.01 , P 值 < 0.001 即非常显著。

表 1-2 相当于概率 5%、1% 及 0.1% 的 t 值 (t 值表)

自由度	5%	1%	0.1%	自由度	5%	1%	0.1%
1	12.706	63.657	636.619	43	2.017	2.696	
2	4.303	9.925	31.596	44	2.015	2.693	
3	3.182	5.841	12.924	45	2.014	2.690	
4	2.776	4.604	8.610	46	2.013	2.688	
5	2.571	4.032	6.869	47	2.012	2.685	
6	2.447	3.707	5.959	48	2.010	2.683	
7	2.365	3.499	5.408	49	2.009	2.680	
8	2.306	3.355	5.041	50	2.008	2.678	
9	2.262	3.250	4.781	51	2.007	2.676	
10	2.228	3.169	4.587	52	2.006	2.674	
11	2.201	3.106	4.437	53	2.006	2.673	
12	2.179	3.055	4.318	54	2.005	2.671	
13	2.160	3.012	4.221	55	2.004	2.669	
14	2.145	2.977	4.140	56	2.003	2.667	
15	2.131	2.947	4.073	57	2.003	2.665	
16	2.120	2.921	4.015	58	2.002	2.664	
17	2.110	2.898	3.965	59	2.004	2.662	
18	2.101	2.878	3.922	60	2.000	2.660	3.460
19	2.093	2.861	3.883	61	1.999	2.659	
20	2.086	2.845	3.850	62	1.999	2.658	
21	2.080	2.831	3.819	63	1.998	2.656	
22	2.074	2.819	3.792	64	1.998	2.655	
23	2.069	2.807	3.767	65	1.997	2.654	
24	2.064	2.797	3.745	66	1.996	2.653	
25	2.060	2.787	3.725	67	1.996	2.652	
26	2.056	2.779	3.707	68	1.995	2.650	
27	2.052	2.771	3.690	69	1.995	2.640	
28	2.048	2.763	3.674	70	1.994	2.648	
29	2.045	2.756	3.659	71	1.994	2.647	
30	2.042	2.750	3.646	72	1.993	2.646	
31	2.040	2.745		73	1.993	2.645	
32	2.037	2.740		74	1.992	2.644	
33	2.035	2.734		75	1.992	2.643	
34	2.032	2.729		76	1.992	2.642	
35	2.030	2.724		77	1.991	2.641	
36	2.028	2.720		78	1.991	2.640	
37	2.026	2.716		79	1.990	2.639	
38	2.025	2.712		80	1.990	2.638	
39	2.023	2.708		81	1.990	2.637	
40	2.021	2.704	3.551	82	1.989	2.637	
41	2.020	2.701		83	1.989	2.636	
42	2.018	2.698		84	1.989	2.636	

续表 1-2

自由度	5%	1%	0.1%	自由度	5%	1%	0.1%
85	1.988	2.635		98	1.985	2.627	
86	1.988	2.634		99	1.984	2.627	
87	1.988	2.634		100	1.984	2.626	
88	1.988	2.633		120			3.373
89	1.987	2.633		125	1.979	2.616	
90	1.987	2.632		150	1.976	2.609	
91	1.987	2.631		200	1.972	2.601	
92	1.987	2.631		300	1.968	2.592	
93	1.986	2.630		400	1.966	2.588	
94	1.986	2.630		500	1.965	2.586	
95	1.985	2.629		1000	1.962	2.581	
96	1.985	2.628		∞	1.960	2.576	3.291
97	1.985	2.628					

第二节 实验记录及报告

如前所述, 由于生物化学实验的对象是生命体或是生物活性物质, 在实验中很容易受外界环境条件的影响, 而引起实验结果的差异。因此, 在实验记录和写实验报告时, 需要实验者做到仔细、认真、实事求是, 只有这样才能获得真实可靠的实验结果。

一、实验记录

(1) 实验前必须认真预习, 弄清实验目的、原理和操作方法, 写出扼要的预习报告, 操作时作为提示和参考。

(2) 准备好便于保存的记录本。在实验中要对观察到的结果及数据及时记录。记录时要准确、客观, 切忌夹杂主观因素, 真实的实验记录才是今后结果分析的可靠依据, 因此, 切勿根据课本中已经了解的可能出现的现象做虚假纪录。

(3) 详细记录实验条件, 如材料的名称和来源, 仪器的名称、生产厂家、规格、型号, 化学试剂的规格、浓度、pH 值等。

(4) 一律用钢笔或圆珠笔记录, 不得涂擦修改, 有笔误处可画去重记。

(5) 如果怀疑观测结果或记录不完整, 必须重做实验。

二、实验报告

实验结束后, 应及时整理和总结实验数据, 写出实验报告。一份好的实验报告应包括以下内容。

1. 标题

标题应包括实验时间、实验地点、实验组号、实验者姓名、实验时条件(如温度、湿度等)

2. 实验名称和实验目的

根据要求写出实验名称和实验目的。

3. 实验原理

应简明扼要地阐述实验的理论指导, 使未做过实验的人看后对该实验有一个初步的

了解。

4. 材料和仪器

对实验材料要写清其来源及规格、浓度、配制方法和配制人。实验仪器要写明其生产厂家、型号、生产序号等常用指标。

5. 操作方法

要描述自己的操作过程及方法,不能完全照抄实验指导书,可简明扼要地把实验步骤一步步写出,也可用工艺流程图或表格形式按照先后顺序表示。实验步骤一定要写得准确明白,以便他人能够重复验证。

6. 实验结果

将实验中的现象、数据进行整理、分析,得出相应的结论。在生物化学实验中最常用的多以图表来表示实验结果,这样可使实验结果清楚明了。特别是在生化实验中通过对标准样品的一系列分析测定,制作图表或绘制标准曲线等,可为以后待测样品的分析提供方便的条件,如通过实验值在图表中直接查出结果。现将常用方法介绍如下。

(1) 列表法:通常将实验所得的各种数据列出表格,在表格的第一行和第一列标出数据的名称或单位,其余行列内只填数字。有的表格在中间或末端的一行内还要添上反应条件如“水浴中加热 5 min”等。

(2) 作图法:实验所得的一系列数据之间的关系及变化情况,常常可用图线表示,这样可直观地分析实验数据。图表法比较适用于实验数据较多的情况,但不宜清楚地表示数据间的情况。如生化实验中用比色法测定未知样品浓度时,常常采用绘制标准样品浓度的工作曲线,然后在同样工作条件下测定未知样品,用所得的数据从标准工作曲线中查出未知样品的浓度。作图时,首先要在坐标纸上标出坐标轴,表明轴的名称和单位,然后在横轴和纵轴上一一找出实验交叉点,用“×”或“·”标注,在用直线或平滑线将各点连接起来。图线不一定经过所有实验数据点,但要求线必须尽量通过或靠近大多数数据点。个别偏离过大的点应舍弃,或重复实验校正。此外,在图上还应标明标题,以防单纯看图的人对此图不知所云。

7. 讨论

讨论是对整个实验过程、实验结果的总结和分析。对得到的正常结果和出现的异常现象以及教师提出的思考题的探讨、研究;也可对实验设计、实验方法提出合理的改进性意见,以便教师今后能更好地安排实验。

第三节 实验样品的制备

生物化学所用的材料通常由动物、植物和微生物提供,其中包括蛋白质、酶、核酸等高分子化合物。但由于得到的样品往往是多种物质的混合物,因此,首先要对其进行处理。

一、动物的脏器

1. 冰冻

刚宰杀牲畜的脏器要剥去脂肪和筋皮等结缔组织,若不马上进行抽提,应置 -10°C 冰箱短期保存,或 -70°C 低温冰箱储存。

2. 脱脂

脏器原料中含有较多的脂肪, 会严重影响纯化操作和制品的收率。一般脱脂的方法是: 人工剥去脂肪组织; 浸泡在脂溶性有机溶剂(丙酮、乙醚)中; 采用快速加热(50℃)、快速冷却方法, 使融化的油滴冷却凝成油块而被除去。也可利用索氏提取器使油脂与水溶液分离。

二、微生物

由于微生物细胞具有繁殖快, 种类多, 培养方便等特点, 因此, 它已成为制备生物大分子物质的主要宿主。用培养一段时间后的微生物菌种, 离心收集上清液, 浓缩后即可制备胞外有效成分。若将菌体破碎后亦可提取胞内有效成分。如培养液不立即使用, 可放置于4℃低温保存1周左右。

三、细胞

细胞是生物体结构的基本单位。细胞除具有细胞膜、细胞质、细胞核外, 还有线粒体、高尔基体等细胞器。通常人们提取的物质主要分布在细胞内, 所以在提取这类物质时, 首先必须破碎细胞。

破碎细胞的方法主要有以下几种。

1. 研磨法

将动、植物组织剪碎, 放入研钵中, 加入一定量的缓冲液, 用研杵用力挤压、研磨。为了提高研磨效果, 可加少量石英砂或海砂来助研, 直到把组织研成较细的浆液为止。此法作用温和, 适用于植物和微生物细胞, 适宜实验室操作。

2. 组织捣碎机法

该方法主要适用于破碎动物组织, 作用比较剧烈。一般把组织切碎置于捣碎机中于8 000~10 000 r/min下处理30~60 s, 即可将细胞完全破碎。但如提取酶液和核酸时, 必须保持低温, 并且捣碎时间不宜太长, 以防有效成分变性。

3. 超声波法

超声波是频率高于2 000 Hz的波, 由于其能量集中而强度大, 振动剧烈, 因而可破坏细胞器。用该法处理微生物细胞较为有效。

4. 冻融法

将细胞置低温下冰冻一段时间, 然后在室温下(或40℃左右)迅速融化, 如此反复冻融几次, 细胞可形成冰粒或在增高剩余胞液盐浓度的同时, 发生溶胀、破溶。

5. 化学处理法

用脂溶性溶剂如丙酮、氯仿和甲苯等处理细胞时, 可把细胞膜溶解, 进而破坏整个细胞。

6. 酶法

溶菌酶具有降解细胞壁的功能, 利用这一性能处理微生物细胞, 可将细胞破碎。

第四节 玻璃仪器的洗涤及各种洗液的配制法

实验中所使用的玻璃仪器清洁与否, 直接影响实验结果, 往往由于仪器的不清洁或被污染而造成较大的实验误差, 甚至会出现相反的实验结果。因此, 玻璃仪器的洗涤清洁工